



花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 的克隆、 原核表达及组织表达谱分析

巩雪芳, 杨 平, 王延来, 郭 莉, 陈 迪, 谢寿安*, 吕淑杰

(西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100)

摘要:【目的】本研究克隆花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylumi* 气味结合蛋白 (odorant binding protein, OBP) 基因 *AzanOBP3*, 并对其进行序列和表达分析, 旨在更好地了解 OBP 基因在花椒窄吉丁成虫触角识别气味物质过程中的作用, 为农林害虫的绿色防控提供理论依据。【方法】利用 RT-PCR 扩增花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 的 cDNA 序列, 采用生物信息学软件分析其核苷酸和氨基酸序列; 构建重组表达载体 pET-28a(+)/*AzanOBP3*, 转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中进行融合蛋白的 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定重组表达蛋白; 基于 qPCR 技术分析 *AzanOBP3* 基因在花椒窄吉丁雌雄成虫不同组织 (头、胸、腹、足和翅) 中的表达情况。【结果】克隆获得了花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 的 cDNA 全长序列 (GenBank 登录号: MT318832), 预测到其开放阅读框长 414 bp, 共编码 137 个氨基酸, 等电点为 4.79, 蛋白分子量为 16.038 kD, N 末端具有 29 个氨基酸组成的信号肽序列, 蛋白序列中具有 6 个保守的半胱氨酸残基, 属于典型的昆虫 OBP。序列分析表明, *AzanOBP3* 的氨基酸序列分别与苹果小吉丁 *Agrilus mali* AmalOBP2 和白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* AplaGOBP 的一致性最高, 分别为 74.45% 和 76.92%, 在进化关系上更加同源。构建了重组表达载体 pET-28a(+)/*AzanOBP3*。在 37℃ 180 r/min 摇床培养及 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 条件下, *AzanOBP3* 在大肠杆菌中成功地表达出了与预测蛋白分子质量大小一致的 *AzanOBP3* 融合蛋白。qPCR 检测结果表明, *AzanOBP3* 基因在雌性和雄性成虫的不同组织中都有表达, 其中在雄成虫足中的表达量最高。【结论】明确了 *AzanOBP3* 的核苷酸和氨基酸序列组成及编码蛋白的理化特性。组织表达谱结果提示, *AzanOBP3* 的功能可能不仅局限于嗅觉识别, 在非嗅觉器官中可能也具有重要的生理功能, 特别是在其寻找寄主植物与取食的过程中可能发挥着重要作用, *AzanOBP3* 功能还需更深入的研究。本研究为今后更深入地探究气味结合蛋白的结构及其在花椒窄吉丁化学感受系统中的作用机制提供依据。

关键词: 花椒窄吉丁; 气味结合蛋白; 基因克隆; 序列分析; 原核表达; 组织表达谱

中图分类号: S763.38 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)04-0390-11

Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of odorant binding protein gene *AzanOBP3* from *Agrilus zanthoxylumi* (Coleoptera: Buprestidae)

GONG Xue-Fang, YANG Ping, WANG Yan-Lai, GUO Li, CHEN Di, XIE Shou-An*, LÜ Shu-Jie
(Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Aim】The objective of this study is to clone the coding sequence of odorant binding protein (OBP) gene *AzanOBP3* in *Agrilus zanthoxylumi* and to analyze its structure properties and expression profile, so as to further understand the process of identifying odorant substances in *A. zanthoxylumi* adult

基金项目: 国家公益性行业 (林业) 项目 (201504324); 云南省林业科技推广示范项目“花椒主要病虫害绿色防控技术推广与应用示范” (云 [2019] TG01 号)

作者简介: 巩雪芳, 女, 1993 年 9 月生, 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向为森林昆虫学, E-mail: 244315334@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shouanxie@163.com

收稿日期 Received: 2019-08-14; 接受日期 Accepted: 2020-01-02

antennae and to provide a new fundamental evidence for the pest management and control. 【Methods】 The cDNA sequence of *AzanOBP3* was amplified from *A. zanthoxylum* with RT-PCR, and the nucleotide and deduced amino acid sequences of the gene were analyzed using different bioinformatics software. The recombinant expression vector pET-28a(+)/*AzanOBP3* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells for expression by IPIG iduction. The recombinant protein was identified by SDS-PAGE and Western blotting. The expression profiles of *AzanOBP3* in different female and male adult tissues (head, thorax, abdomen, leg and wing) of *A. zanthoxylum* were detected by qPCR. 【Results】 We cloned the full-length cDNA sequence of *AzanOBP3* (GenBank accession no. : MT318832) from *A. zanthoxylum*. Its ORF is 414 bp in length, encoding 137 amino acids, with a predicted molecular weight of 16.038 kD and the isoelectric point of 4.79, and a signal peptide sequence of 29 amino acids at the N terminus. The encoded protein has six conserved cysteines belonging to the typical insect OBPs. Homologous sequence alignment analyses showed that *AzanOBP3* has the highest amino acid sequence identity with AmalOBP2 from *Agrilus mali* and AplaGOBP from *Agrilus planipennis* (74.45% and 76.92%, respectively). The recombinant expression vector pET-28a(+)/*AzanOBP3* was successfully constructed and the target protein was stably expressed in host bacteria in the form of fusion protein after culture at 37℃ 180 r/min in a shaker incubator and induction with 1 mmol/L IPTG for 4 h. The qPCR results revealed that *AzanOBP3* was expressed in various tissues of male and female adults of *A. zanthoxylum*, with the highest expression level in the male adult leg. 【Conclusion】 In this study, the nucleotide and amino acid sequences of *AzanOBP3* and the physiochemical properties of its encoded protein were clarified. The tissue expression profile suggests that *AzanOBP3* may not be limited to the recognition of olfactory odorant, also have physiological functions in non-olfactory tissues, and especially may play important roles during insect feeding and host locating. Its functions need further study. This study provides a basis for exploring the molecular structure of odorant binding proteins and their functional mechanisms in the chemical sensing system of *A. zanthoxylum*.

Key words: *Agrilus zanthoxylum*; odorant binding protein; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression; tissue expression profile

昆虫在其长期进化过程中,依靠着灵敏的嗅觉系统来生存和适应环境变化(王桂荣等,2002),在其交配、产卵、对寄主植物定位和选择等行为中,嗅觉器官均发挥着至关重要的作用(王超群等,2017;陈东凯等,2018)。昆虫在其嗅觉感受信息物质的过程中,形成了多种分布形式不一,执行着不同功能的嗅觉相关蛋白,它们通过各自的分工与合作组成了精密复杂的嗅觉系统,进而共同来调节昆虫嗅觉和其他生理活动(孙可可,2018)。这些嗅觉相关蛋白主要包括气味结合蛋白(odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)、气味受体(odorant receptors, ORs)、离子型受体(ionotropic receptors, IRs)、感受神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)和气味降解酶(odorant-degrading enzymes, ODEs)等(胡颖颖等,2013;詹文会等,2018)。在昆虫嗅觉感受的过程中,OBP 选择性地与某些特定类型的气味分子

相结合,起到过滤器的作用(Pelosi and Maida, 1995)。花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylum* 为鞘翅目(Coleoptera)吉丁虫科(Buprestidae)窄吉丁属 *Agrilus*,广泛分布于我国北方的花椒产区,包括陕西、甘肃、山东、山西等地(党国刚等,2017)。幼虫主要是通过取食韧皮部后逐渐开始蛀食形成层,受害部位症状表现为虫疤松软湿润,椒农称之为“流油”(焦浩,2011;李辉,2013)。成虫通过取食叶片补充营养,造成叶片缺刻、空洞,树皮大量流胶、软化、腐烂干枯、龟裂最后脱落甚至整株死亡(高焕婷和张国龙,2007;杜平,2012;王燕等,2012)。近年来,在花椒产业的发展过程中构成了巨大威胁,给椒农带来了严重的经济损失(权丽君,2016)。因此,如何更有效、更环保地防治花椒窄吉丁已引起广大椒农和病虫害防治部门的高度重视。

OBP 最早发现于鳞翅目昆虫,之后在鞘翅目、膜翅目、同翅目、双翅目等昆虫中也相继被发现(李

正西和 Zhou JJ, 2004; Wang *et al.*, 2013; 宋月芹等, 2014)。迄今为止, OBP 已在斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*、亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*、绿盲蝽 *Apolygus lucorum*、松墨天牛 *Monochamus alternatus*、云斑天牛 *Batocera lineolata*、椰甲截脉姬小蜂 *Asecodes hispinarum*、白背飞虱 *Sogatella furcifera*、烟粉虱 *Bemisia tabaci*、梨小食心虫 *Grapholita molesta*、大草蛉 *Chrysopa pallens*、中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*、茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 和柑橘大实蝇 *Bactrocera minax* (金丰良等, 2008; 程晓东等, 2011; Huang *et al.*, 2013; 梁庆梅, 2014; Li K *et al.*, 2015; Li ZQ *et al.*, 2015; 钱凯等, 2015; Cui *et al.*, 2016; 蒋艳东等, 2016; 王然等, 2016; 张国辉和仵军祥, 2016; 卓志航等, 2016; 冯一璐等, 2017; 司品法等, 2018) 等近 100 种昆虫中被报道。OBPs 是一类可溶性的小分子量亲和球蛋白, 相对分子量约为 15 ~ 17 kD, 氨基酸的数量为 120 ~ 160 个, 等电点为 4.4 ~ 5.2 (Briand *et al.*, 2001)。N 末端有一段 20 个氨基酸左右的信号肽, 序列中具有 6 个保守的半胱氨酸位点 (Pelosi *et al.*, 2006; Steinbrecht, 2010); 二级结构由 α -螺旋、LOOP 环所形成的二硫键组成, 在其三级结构中起到了支撑作用 (Vogt and Riddiford, 1981; Scaloni *et al.*, 1999; Damberger *et al.*, 2007; Jacquinjoly *et al.*, 2010)。目前国内对花椒窄吉丁的研究主要集中于化学防治和生物学特性方面 (刘绥鹏等, 2016; 袁丽芳等, 2016), 国外几乎无相关研究报道, 但是化学防治方法具有难奏效、农药残留、污染环境等弊端。近几年, 本实验室已对花椒窄吉丁的寄主植物花椒挥发物的组成进行了鉴定 (袁丽芳等, 2016), 初步获得了对成虫有电生理活性和行为活性的组分 (刘绥鹏, 2017); 同时也对花椒窄吉丁成虫后肠和粪便提取物中的挥发性物质、成虫的电生理活性和行为活性做了测定 (刘绥鹏等, 2016)。但是, 对其气味结合蛋白及气味物质与寄主挥发物的结合机理研究还处于空白。因而探究花椒窄吉丁气味结合蛋白的理化特性与结构对其明确功能和作用机理就显得至关重要。

本研究通过实验室前期构建的花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组数据进行相关的生物信息学分析, 通过 BLAST 同源比对的方法分析鉴定出了与花椒窄吉丁化学感受相关的气味结合蛋白基因 *AzanOBP3*, 利用在线软件分析预测 *AzanOBP3* 基因的理化特性和结构, 将其氨基酸序列与其他的已研究发表过的鞘翅目昆虫气味结合蛋白氨基酸序列比

对, 通过构建系统发育进化树的方法, 进行亲缘关系初步推断与分析。通过 RT-PCR 技术首次克隆鉴定花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3*, 通过酶切重组的方法将扩增产物插入 pET-28a(+) 载体构建重组表达载体, 转化感受态细胞进行了表达; 并采用 qPCR 技术分析了 *AzanOBP3* 基因在花椒窄吉丁雌雄成虫不同组织中的表达情况, 期望本研究结果为今后继续开展其配基结合特性研究并应用于农林害虫的绿色防控技术诱芯的筛选与制备奠定基础, 为农林业鞘翅目蛀干害虫在搜寻寄主、吸引配偶、寻找产卵场所等行为活动领域的研究提供重要的理论支撑。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫的采集与样品收集

2018 年 5 - 7 月于陕西省西安市蓝田县普化镇周董村的花椒园采集花椒窄吉丁成虫。提取 RNA 前选取 1 000 头活动能力较强的成虫, 解剖镜下分别切下雌雄成虫触角, 液氮冷冻并保存于 -80℃ 低温冰箱中备用。

1.2 总 RNA 的提取与 cDNA 第 1 链的合成

采用 Trizol 法 (Trizol, Invitrogen) 提取花椒窄吉丁成虫触角以及雌雄成虫头、胸、腹、足和翅总 RNA, 具体步骤依据 Invitrogen 说明书进行。总 RNA 的质量 1% 琼脂糖凝胶电泳检测; 根据 NanaDrop2000 紫外可见光分光光度计检测 RNA 样品的完整性和浓度。采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (Thermo) 合成 cDNA 第 1 链备用。

1.3 花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 的克隆

以 1.2 节中合成的花椒窄吉丁雌雄成虫触角 cDNA 作为模板, 根据花椒窄吉丁成虫触角转录组测序注释到的候选 OBP3 基因设计 1 对特异性引物 (表 1), 进行目的基因 PCR 克隆。PCR 反应体系: cDNA 模板 < 1 μ g, 正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 $\times$ Reaction Mix 12.5 μ L, ddH₂O 补至 25 μ L。扩增程序: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 胶回收的目的片段连接到 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 最后将鉴定的阳性克隆菌株送北京奥科生物有限公司进行测序。

表 1 实验中所用引物
Table 1 Primers used in the experiment

引物 Primers	引物序列(5′-3′) Primer sequences	引物用途 Primer use
AzanOBP3-F1	CAAGCCGTTTTGCAATGACTC	cDNA 克隆和 qPCR
AzanOBP3-R1	TGATCCATAGCATGTCGTCGT	cDNA cloning and qPCR
AzanOBP3-xF1	CGCGGATCCATGACTCAAATTATATATTTTG	蛋白表达
AzanOBP3-xR1	CCGCTCGAGTCAAGGCAAAAACCAATGCTTA	Expression of protein
Actin-F1	ACCCATCTATGAAGGTTACGC	qPCR
Actin-R1	GCAAAGTTTTACCTTGATGTCC	
28S-2 F1	GAAATGAGTCCGAGGCAAAA	
28S-2 R1	TAAACAGGAAGTGGTGAGGC	

下划线序列分别表示内切酶 *Bam* H I (GGATCC) 和 *Xho* I (CTCGAG) 酶切位点。雌成虫内参基因用 *Actin*, 雄成虫内参基因用 28S-2。Restriction sites of *Bam* H I (GGATCC) and *Xho* I (CTCGAG) are underlined, respectively. The reference gene used for female adult is *Actin* and for male is 28S-2.

1.4 生物信息学分析

利用在线程序 Expasy 对目的基因序列进行翻译(<http://expasy.org/translate/>),预测其蛋白分子量、等电点及其他的理化特性(<http://expasy.org/protparam/>);Open Reading Frame Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 预测其开放阅读框;SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测其信号肽,通过 NCBI 中的 BLAST 进行氨基酸序列的同源比对。在花椒窄吉丁 *AzanOBP3* 与其他昆虫 OBPs 的系统发育进化树构建中,先采用 Clustalx1.83 进行多序列比对,然后利用 MEGA5.0 软件并采用最大似然法(maximum likelihood, ML) (Bootstrap:1 000 次)来构建进化树分析亲缘关系的远近。

1.5 构建原核表达载体及 IPTG 诱导融合蛋白表达

根据花椒窄吉丁 *OBP3* 的编码序列及表达载体 pET-28a(+) 设计带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的引物序列(表 1)。以雌雄成虫触角 cDNA 为模板进行 PCR 扩增(Golden Easy PCR System)。PCR 反应体系(25 μL): cDNA 模板 < 1 μg, 正反向引物(10 μmol/L) 各 1 μL, 2 × Reaction Mix 12.5 μL, ddH₂O 补至 25 μL。扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环;72℃ 延伸 5min。将扩增产物纯化回收(QIA QuickR Gel Extraction Kit, QIAGEN)后连接到 pMD18-T 克隆载体(TaKaRa, Clontech)中,然后转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,经蓝白斑筛选后挑取阳性菌落振荡培养 12 ~ 16 h (37℃, 220 r/min),提取质粒[Plasmid Mini Kit I (OMEGA)试剂盒] DNA 并测序验证(北京奥科生物有限公司测序)。将

含有目的片段的重组克隆质粒 DNA 和 pET-28a(+) 质粒 DNA 分别进行酶切,在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的片段连接到表达载体 pET-28a(+) 上,再转化到大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,用含有卡那霉素(Kan)的 LB 平板培养基进行筛选,挑取阳性克隆进行培养,小量提取质粒后测序验证。将测序验证正确的重组质粒 pET-28a/*AzanOBP3* 转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,涂板培养后挑取单菌落于 LB 培养液中振荡培养(37℃ 220 r/min, 12 ~ 16 h),将小量培养后的菌液按 1: 100(v/v)的比例接种于新鲜的 LB 培养液(含 Kan 50 μg/mL)中,37℃ 220 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8 时,加入终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h,然后离心收集菌体,将菌体重新悬浮后超声波破碎,12 000 r/min 离心 30 min,收集上清和沉淀,SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况。

1.6 融合蛋白的 Western blot 检测

将 PVDF 膜和滤纸分别裁剪成与凝胶相同的大小,使用转膜缓冲液处理后,按照滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸的顺序依次放在转膜仪的电极板之间,开始转膜。设置转膜仪参数:电流(62 mA)、转印时间(80 min),将 PVDF 膜置于含 1.5% BSA 的 10 mL Blocking Buffer 中,4℃ 平放过夜封闭。使用稀释后的 Penta-His Antibody 溶液 6 mL,进行一次抗体反应 1 h。TBST 缓冲液(20 mL)洗涤 2 次;洗涤 TBST 缓冲液漂洗 3 次,每次 5 min。使用稀释后的 HRP-Rabbit Anti-Mouse IgG 抗体溶液 6 mL,进行二次抗体反应 1 h。TBST 缓冲液(20 mL)洗涤 2 次;洗涤 TBST 缓冲液冲洗 3 次。滴 1 mL TrueBlue Peroxidase Substrate 显色 1 min;10 mL Western Bright™ ECL 显

色 5 min,在暗室中进行曝光显色反应。

1.7 qPCR 检测 AzanOBP3 基因在花椒窄吉丁雌雄成虫各组织中的表达谱

根据花椒窄吉丁气味结合蛋白编码基因全长序列设计 qPCR 引物(表 1),研究 AzanOBP3 基因在不同组织部位中的表达情况,雌成虫内参基因用 Actin,雄成虫内参基因用 28S-2,qPCR 所用的引物序列见表 1。以 1.2 节合成的花椒窄吉丁雌雄成虫不同组织的 cDNA 第 1 链为模板,PCR 反应体系(20 μL): 2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10.0 μL,正反向引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 补充 ddH₂O 到 20 μL 混匀(试剂盒为 Vazyme ChamQ™SYBR® qPCR Master MixQ311-02/03)。扩增程序: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 10 s, 95℃ 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环,之后从 65 ~ 95℃ 之间进行熔解曲线分析以排除非特异性 PCR 产物的污染,每个样品 3 次生物学重复,3 次技术重复。

1.8 数据分析

采用 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪相应软件进行数据分析,EXCEL 整理数据。相对定量采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 OBP3 在不同组织的相对表达量,采用 Duncan 氏多重比较检验法比较分析花椒窄吉丁成虫不同组织中目的基因表达量的差异显著性,采用独立样本 T 检验(independent samples t-test)检测雌雄成虫同一组织中的基因表达量的差异显著性。

2 结果

2.1 花椒窄吉丁 AzanOBP3 基因的克隆和序列分析

PCR 同源克隆获得了花椒窄吉丁气味结合蛋白编码基因片段大小符合预期结果。AzanOBP3 基因 cDNA 全长 614 bp(GenBank 登录号: MT318832),上游有起始密码子 ATG,下游有终止密码子 TGA,包括一个 414 bp 的开放阅读框(ORF),编码 137 个氨基酸残基,其 5'和 3'端分别有 35 bp 和 142 bp 的非编码区。在线预测到成熟蛋白分子量为 16. 038 kD,理论等电点为 4. 79,而且该蛋白氨基酸序列中具有 6 个保守半胱氨酸(C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 和 C₆)(图 1),符合典型气味结合蛋白家族特征。

花椒窄吉丁 AzanOBP3 N 端前 29 位氨基酸为信号肽,在第 29 和 30 位氨基酸之间存在一个信号肽切割位点,该特征符合分泌蛋白特征。AzanOBP3

ATG	ACT	CAA	ATT	ATA	TAI	TTT	GCT	GTT	GCC	GTG	TTA	TTT	TGT
M	T	Q	I	I	Y	F	A	V	A	V	L	F	C
TAT	GCA	AAC	GCT	CGT	CCT	GAA	GAC	TAT	CCT	CCT	GCT	GAT	G
Y	A	N	A	R	P	E	D	Y	P	P	A	A	D
GTT	TTG	GAA	TTA	CTG	AAA	CCA	TTC	CAC	GAT	AAG	TGT	ACC	
V	L	E	L	L	K	P	F	H	D	K	C	T	
CAA	GAG	CTT	GGT	GTC	ACA	GAT	GAT	GAA	ATT	AAA	AAT	TAT	
Q	E	L	G	V	T	D	D	E	I	K	N	Y	
AAG	ATT	GAA	GAT	AAA	TCG	GAA	AAA	ATG	ATG	TGT	TAC	ATG	AGG
K	I	E	D	K	S	E	K	M	M	C	Y	M	R
TGT	TTA	GGT	TTG	GAA	TCC	AAA	TGG	CTT	AGT	CCT	GAA	AAC	AAA
L	G	L	E	S	K	W	L	S	P	E	N	K	
TTA	CAA	GTT	GAT	TTC	ATT	ATG	GAA	ACA	AGG	TTC	GAT	TCT	ATG
L	Q	V	D	F	I	M	E	T	R	F	D	S	M
GTA	ATA	AAA	AAT	TTT	GTG	GAA	AAT	TGT	AAA	GAC	GTT	CCT	GAT
V	I	K	N	F	V	E	N	C	K	D	V	P	D
GAT	GAA	TGT	GAA	AAA	GCC	TAC	AAT	TTA	CAC	AAA	TGT	GAA	GCA
H	E	E	K	A	Y	N	L	H	K	E	A	E	T
GAT	CCT	AAG	CAT	TGG	TTT	TTG	CCT	TGA					
D	P	K	H	W	F	L	P	*					

图 1 花椒窄吉丁 AzanOBP3 核苷酸序列及其推导氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of AzanOBP3 from Agrilus zanthoxylum

保守位点上的半胱氨酸用红色方框表示,信号肽用单下划线表示。The conserved cysteines are indicated in red box, and the predicted signal peptide is underlined.

有多个比较明显的疏水区,可能是亲脂性的气味分子的结合位点,该蛋白上有较少的区域能够结合脂类气味分子,有亲脂性的氨基酸即可能与疏水性的气味物质结合,又有可能与亲水性的物质结合,有较多数量的亲水性氨基酸,暗示该蛋白可能是一种能够与水亲和的球蛋白。AzanOBP3 第 1 - 137 位氨基酸均位于细胞膜表面,预测蛋白 AzanOBP3 不包含跨膜螺旋,这与该蛋白的疏水性区域分析结果基本一致,表明 AzanOBP3 具一个有细胞信号传导功能的膜受体蛋白。通过 SOPMA 工具预测到花椒窄吉丁 AzanOBP3 的二级结构是由 56. 93% 的 α-螺旋、7. 3% 的延伸链、3. 65% 的 β-转角和 32. 12% 的无规则卷曲组成。

2.2 花椒窄吉丁 AzanOBP3 序列比对和系统进化发育分析

将 AzanOBP3 的氨基酸序列与已报道的鞘翅目其他几种昆虫的 OBPs 进行多重联配(图 2),发现每种昆虫 OBP 氨基酸序列中均有 6 个保守的半胱氨酸位点,且分布符合 C₁-X₂₀₋₆₆-C₂-X₃-C₃-X₂₁₋₄₃-C₄-X₈₋₁₄-C₅-X₈-C₆ 和 C₁-X₁₅₋₃₉-C₂-X₃-C₃-X₂₁₋₄₄-C₄-X₇₋₄₂-C₅-X₈-C₆(X 为除半胱氨酸以外的其他氨基酸)的典型特征。通过对 AzanOBP3 序列同源性搜索(BLASTX)发现,AzanOBP3 与苹果小吉丁 Agrilus mail 和白蜡窄吉丁 Agrilus planipennis OBPs 的氨基酸序列一致性最高,分别达 74. 45% 和 76. 92%,表明它们之间在进化关系上更加同源,与已知其他昆虫的 OBPs 的氨基酸序列一致性较低,均小于 50%。

花椒窄吉丁气味结合蛋白 AzanOBP3 的氨基酸序列与已报道的鞘翅目其他昆虫如苹果小吉丁

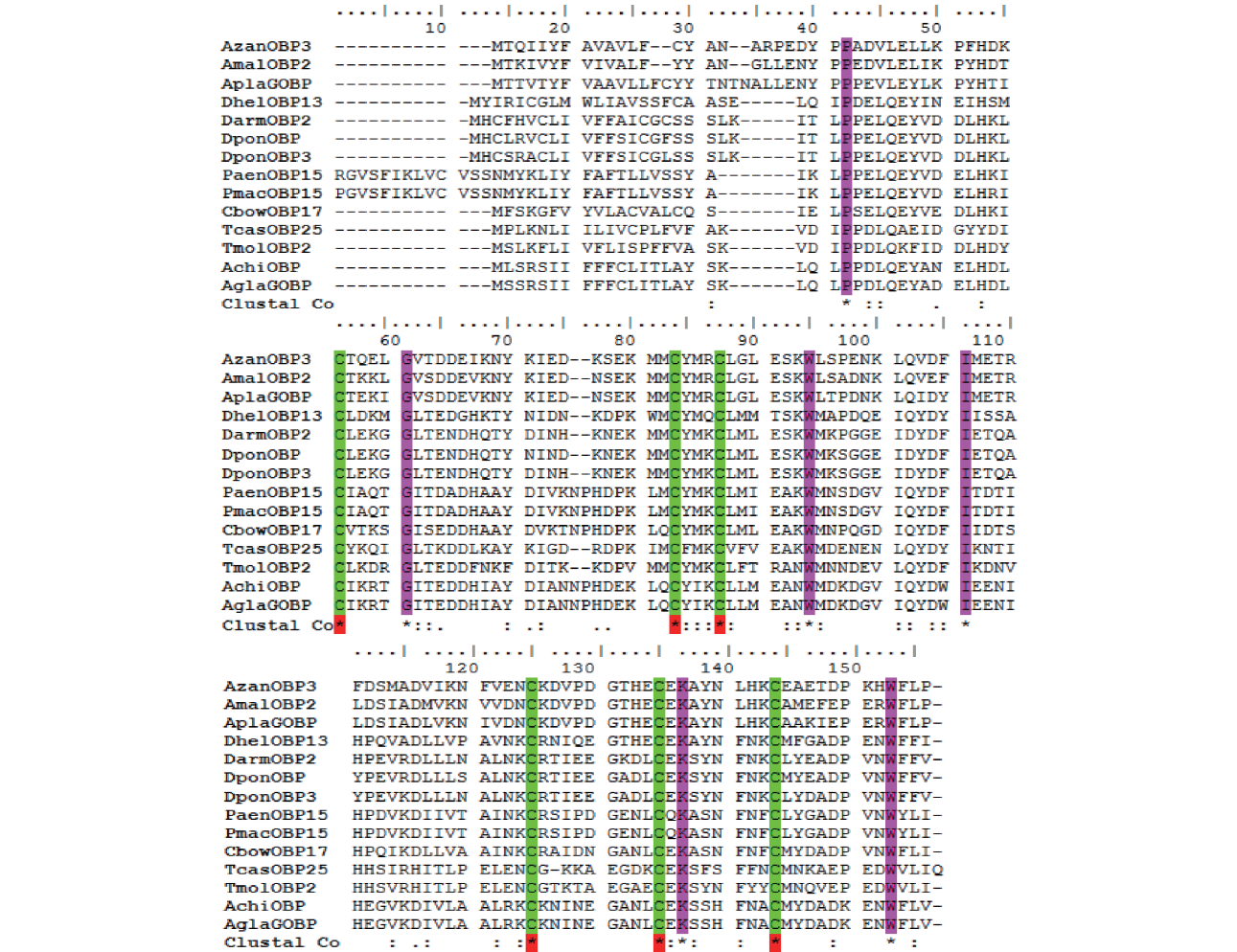


图2 AzanOBP3 与其他昆虫 OBPs 氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acid sequence of AzanOBP3 with OBPs from other insects

OBPs 来源物种及 GenBank 登录号 Source species of OBPs and their GenBank accession numbers: AzanOBP3: 花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylum* (MT318832); AmalOBP2: 苹果小吉丁 *Agrilus mail* (MF615491.1); AplaGOBP: 白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* (XP_025829930.1); DheloBP13: 花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* (AIX97059.1); DarmOBP2: 华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* (AIY61045.1); DponOBP: 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (AFI45061.1); DponOBP3: 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* (AKK25131.1); PaenOBP15: 榆蓝萤叶甲 *Pyrrhalta aenescens* (APC94288.1); PmacOBP15: 榆黄毛萤叶甲 *Pyrrhalta maculicollis* (APC94206.1); CbowOBP17: 大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* (ALR72505.1); TcasOBP25: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (EFA04747.2); TmolOBP2: 黄粉虫 *Tenebrio molitor* (AJM71476.1); AchiOBP: 星天牛 *Anoplophora chinensis* (AUF72991.1); AglaGOBP: 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (XP_023310142.1). 图3 同 The same for Fig. 3. 红色星号表示保守位点上的半胱氨酸。绿色区域表示包含普通气味结合蛋白在内的所有气味结合蛋白结构中的相同保守结构域位点。紫色表示所有气味结合蛋白结构中相同的氨基酸。Conserved cysteines are indicated with the red asterisk. The green region represents the same conserved domain site in all odorant binding protein structures including the common odorant binding protein. Purple region indicates the same amino acid in all odorant binding protein structures.

Agrilus mail 的 AmalOBP2, 白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* 的 AplaGOBP, 花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides* 的 DheloBP13, 华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi* 的 DarmOBP2, 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae* 的 DponOBP3, 榆蓝萤叶甲 *Pyrrhalta aenescens* 的 PaenOBP15, 榆黄毛萤叶甲 *Pyrrhalta maculicollis* 的 PmacOBP15, 大猿叶甲 *Colaphellus bowringi* 的 CbowOBP17, 星天牛

Anoplophora chinensis 的 AchiOBP, 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* 的 AglaGOBP, 模式昆虫赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 TcasOBP25 和黄粉虫 *Tenebrio molitor* 的 TmolOBP2 的氨基酸序列的系统发育树发现, AzanOBP3 与苹果小吉丁的 AmalOBP2 和白蜡窄吉丁的 AplaGOBP 相似度最高, 氨基酸序列一致性达到了 100%, 这说明气味结合蛋白在这几种昆虫间的亲缘关系较近(图3)。

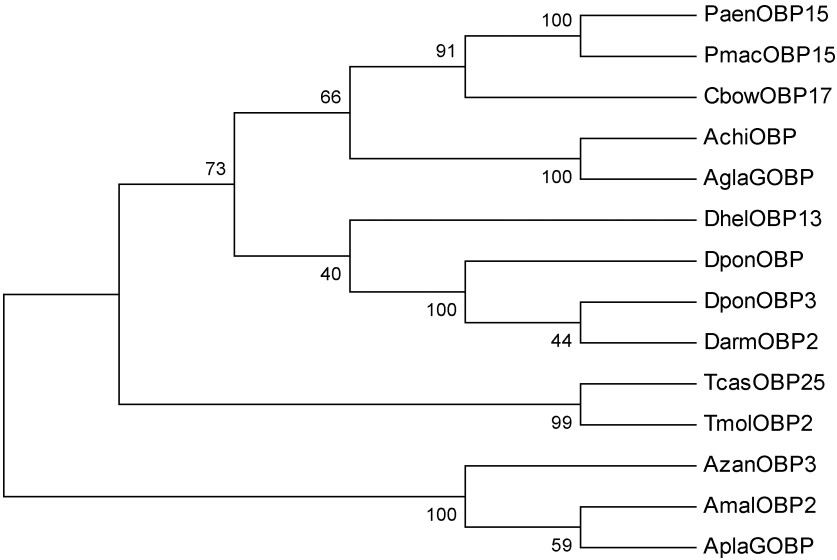


图 3 基于花椒窄吉丁 *AzanOBP3* 和其他昆虫 *OBP* 蛋白氨基酸序列的系统进化树分析(最大似然法)
Fig. 3 Phylogenetic tree of *AzanOBP3* from *Agrilus zanthoxylumi* and OBPs from other insects based on the amino acid sequences (maximum likelihood method)

2.3 *AzanOBP3* 的原核表达及 Western blot 检测

成功构建了 pET-28a(+)/*AzanOBP3* 原核表达载体,37℃ 180 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.6 时添加 150 mmol/L IPTG 33 μL(终浓度为 1 mmol/L IPTG)进行诱导表达,37℃ 培养 4 h。取变性后的样品 10 μL 进行上样,SDS-PAGE 结果如图 4(A)所

示,在大肠杆菌中成功地表达出了与预测蛋白分子质量大小一致的 *AzanOBP3* 融合蛋白。通过对重组蛋白纯化后样品进行 Western blot 分析,结果显示在样品相应位置有明显信号,且检测到 His-Tag 标签蛋白,显色后的 PVDF 膜如图所示(4: B)。

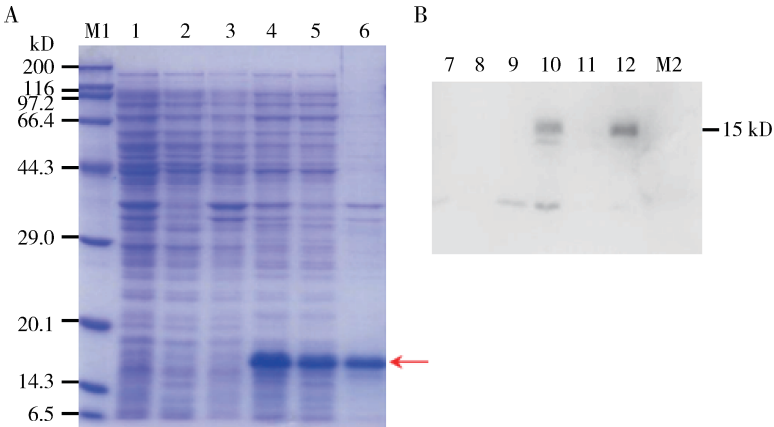


图 4 重组蛋白 *AzanOBP3* 的 SDS-PAGE 检测(A)和 Western blot(B)分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis (A) and Western blotting (B) of recombinant protein *AzanOBP3*
M1, M2: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker (Broad); 1: IPTG 诱导前全蛋白 Whole protein before IPTG induction; 2: IPTG 诱导前上清 Supernatant before IPTG induction; 3: IPTG 诱导前沉淀 Precipitate before IPTG induction; 4: 经 IPTG 诱导后的全蛋白 Whole protein after induction with IPTG; 5: 经 IPTG 诱导后的上清 Supernatant after induction with IPTG; 6: 经 IPTG 诱导后的沉淀 Precipitate after induction with IPTG; 7: IPTG 诱导前全蛋白 Whole protein before IPTG induction; 8: IPTG 诱导前上清 Supernatant before IPTG induction; 9: IPTG 诱导前沉淀 Precipitate before IPTG induction; 10: IPTG 诱导后的全蛋白 Whole protein after induction with IPTG; 11: IPTG 诱导后的上清 Supernatant after induction with IPTG; 12: IPTG 诱导后的沉淀 Precipitate after induction with IPTG.

2.4 *AzanOBP3* 在花椒窄吉丁成虫不同组织中的表达量

根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量法,以雄成虫足中的表达

量为基准,测定 *AzanOBP3* 在花椒窄吉丁成虫不同组织中的表达谱。结果表明(图 5),*AzanOBP3* 在雌雄虫头、胸部、腹部、足、翅中均有表达,且表达量不

一,在雄成虫各组织的表达量为:足>胸部>头部>翅>腹部;在雌成虫不同组织中表达量为:头>腹部>足>翅>胸部。*AzanOBP3* 在雌雄成虫间各组织(除足部)中的表达量差异不显著($P>0.05$),仅

在足中雄成虫的表达量显著高于雌成虫($P=0.0227$);但除腹部以外,雄成虫各组织中的表达量均较雌虫的要高些。

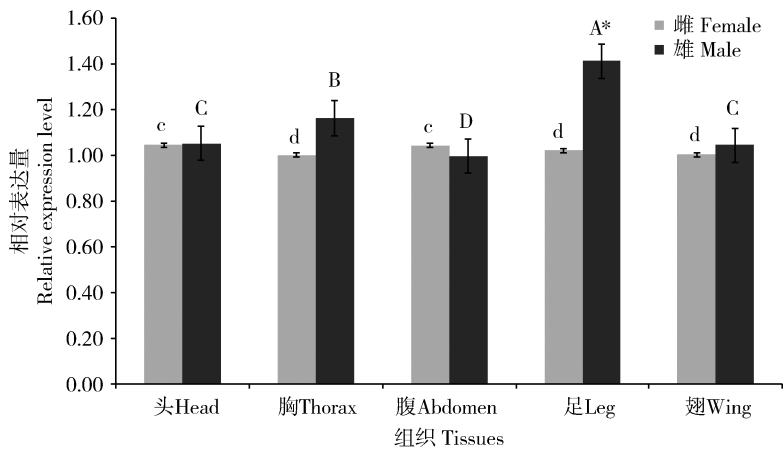


图5 *AzanOBP3* 在花椒窄吉丁成虫各组织中的表达量分析

Fig. 5 Expression profile of *AzanOBP3* in various tissues of *Agrilus zanthoxylum* adults
图中数据为平均值±标准差;柱上不同小写字母和大写字母分别表示雌成虫和雄成虫不同组织间的表达量差异显著($P<0.05$, Duncan 氏多重检验);柱上星号示雌雄成虫同一组织中的表达量差异显著($P<0.05$, t 检验)。Data in the figure are mean±SD. Different lowercase and capital letters above bars indicate significantly different gene expression levels among different tissues of female and male adult, respectively ($P<0.05$, Duncan's multiple range test). The asterisk above bars indicates significant difference in the gene expression level in the same tissue between female and male adults ($P<0.05$, t -test)

3 讨论

昆虫的触角对于信息素的聚集、寄主和非寄主挥发性物质的特异性识别起着至关重要的作用(Huang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015)。本研究是基于花椒窄吉丁成虫触角转录组测序所获得的序列数据基础,通过预测其开放阅读框和氨基酸序列的方法,成功克隆得到了花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 开放阅读框的全长序列。序列分析表明,*AzanOBP3* 基因编码的氨基酸序列具有 6 个保守的半胱氨酸残基,编码 137 个氨基酸组成的多肽,在第 29–30 位氨基酸存在一个信号肽切割点,预测的蛋白分子量为 16.038 kD,等电点(pI)为 4.79。

将 *AzanOBP3* 的氨基酸序列与其他几种已报道的鞘翅目昆虫气味结合蛋白进行多重联配,发现每个昆虫气味结合蛋白氨基酸序列中均有 6 个保守的半胱氨酸位点, *AzanOBP3* 与苹果小吉丁的 *AmalOBP2* 和白蜡窄吉丁的 *AplaGOBP* 的同源性最高,氨基酸序列一致性分别达 74.45% 和 76.92%,表明它们之间在进化关系上更加同源。理化特性分析发现, *AzanOBP3* 具有多个比较明显的疏水区,有

较少的区域能够结合脂类气味分子,有亲脂性的氨基酸即可能与疏水性的气味物质结合,又有可能与亲水性的物质结合。昆虫 OBPs 是一类水溶性小分子量酸性蛋白,其典型特征是在二级结构中存在 6 个保守的半胱氨酸,分别交叉形成 3 个二硫键,因此对其三维结构起到支撑作用(Briand *et al.*, 2001), *AzanOBP3* 的二级结构由 56.93% 的 α -螺旋、7.3% 的延伸链、3.65% 的 β -转角和 32.12% 的无规则卷曲组成。

气味结合蛋白作为载体,负责筛选、结合以及运输疏水性气味分子到达特异性气味受体,是昆虫感知外界环境的基础(Vogt and Riddiford, 1981; Steinbrecht *et al.*, 1995),能够与特定的气味分子相结合,推测具有选择气味的功能,是昆虫了解外界环境的首当其冲的反应(黄恩炯等, 2008; 钟涛等, 2008; Zhou *et al.*, 2009; 张升祥等, 2010; Pelletier and Leal, 2011; 李慧等, 2018)。本研究对 *AzanOBP3* 在花椒窄吉丁雌雄成虫不同组织中的相对表达量进行了比较分析,结果表明 *AzanOBP3* 在雄成虫足中的表达量最高,推测雄虫对气味结合的能力要强于雌虫,且 *AzanOBP3* 的功能可能不仅局限于嗅觉识别。经原核表达发现,融合蛋白在总蛋

白中表达量较大,而在可溶性蛋白部分表达量相对较少,且 SDS-PAGE 中的表观分子量比预测的分子量偏大,猜测造成融合蛋白 His-AzanOBP3 表观分子量偏差的原因可能是 His 标签(唐威华等,2000),至于该猜测是否准确还需进行蛋白纯化后切去蛋白标签后 SDS-PAGE 检测验证,以便为今后配基结合特性的研究提供良好的融合蛋白。

组织表达谱分析发现,AzanOBP3 在雄成虫足中的表达量最高,提示 AzanOBP3 不仅在成虫的嗅觉识别中发挥着重要的作用,在花椒窄吉丁成虫非嗅觉组织中可能也具有重要的生理功能,同时也可能与雄性成虫寻求配偶的选择性有关联。AzanOBP3 是首次报道的花椒窄吉丁的 OBP 基因,对本实验已克隆的 AzanOBP3 基因,将由本实验室继续进行表达纯化其蛋白,通过荧光竞争结合等实验明确该气味结合蛋白的结合谱,为探讨该蛋白分子结构及其在花椒窄吉丁成虫触角感受化学信息物质的作用机理提供依据,为今后高效开发和设计花椒窄吉丁生物信息素的绿色防控引诱剂的筛选奠定基础。

参考文献 (References)

Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Pernollet JC, 2001. Disulfide pairing and secondary structure of ASP1, an olfactory-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.). *J. Peptide Res.*, 58(6): 540–545.

Chen DK, Zhang LY, Xing ZL, Lei ZR, 2018. Identification and function of the OBP13 protein from the leafminer (*Liriomyza sativae*). *Sci. Agric. Sin.*, 51(5): 893–904. [陈东凯, 张林雅, 邢振龙, 雷仲仁, 2018. 美洲斑潜蝇气味结合蛋白 OBP13 的鉴定与功能. 中国农业科学, 51(5): 893–904]

Cheng XD, An SH, Wang HT, Wang TT, Luo MH, Guo XR, Yuan GH, 2011. cDNA cloning, prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of GOBP2 from *Ostrinia furnacalis* (Guenée). *Sci. Agric. Sin.*, 44(10): 2029–2038. [程晓东, 安世恒, 王海亭, 王甜甜, 罗梅浩, 郭线茹, 原国辉, 2011. 亚洲玉米螟 GOBP2 的克隆、原核表达及多克隆抗体制备. 中国农业科学, 44(10): 2029–2038]

Cheng XJ, Cai LJ, Zheng LS, Qin JM, Huang YP, You MS, 2016. Cloning, expression profiling and binding characterization of the OBP2 gene in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(4): 365–376. [程小娟, 蔡立君, 郑丽双, 覃江梅, 黄宇萍, 尤民生, 2016. 小菜蛾气味结合蛋白 OBP2 基因的克隆、表达谱及其结合特性分析. 昆虫学报, 59(4): 365–376]

Cui HH, Gu SH, Zhu XQ, Wei Y, Liu HW, Khalid HD, Guo YY, Zhang YJ, 2017. Odorant-binding and chemosensory proteins identified in the antennal transcriptome of *Adelphocoris suturalis* Jakovlev. *Comp. Biochem. Physiol. Part D*, 24: 139–145.

Damberger FF, Ishida Y, Leal WS, Wüthrich K, 2007. Structural basis

of ligand binding and release in insect pheromone-binding proteins: NMR structure of *Antheraea polyphemus* PBP1 at pH 4.5. *J. Mol. Biol.* 373(4): 811–819.

Dang GG, Guo JC, Sun DC, Zhuang LJ, 2017. Risk analysis of damage caused by *Agrilus zanthoxylumi* in Weinan city. *Prot. For. Sci. Technol.*, (4): 59–61. [党国刚, 郭军成, 孙杜闯, 庄丽娟, 2017. 渭南市花椒窄吉丁虫危害风险分析. 防护林科技, 163(4): 59–61]

Du P, 2012. Occurrence and control study of *Agrilus zanthoxylumi*. *J. Green Sci. Technol.*, 27(8): 57–58. [杜平, 2012. 花椒吉丁虫的发生与防治研究. 绿色科技, 27(8): 57–58]

Feng YL, Fu XB, Wu F, Cui HC, Li HL, 2017. Molecular cloning, prokaryotic expression and binding functions of pheromone binding protein 2 (PBP2) in the *Ectropis obliqua*. *Sci. Agric. Sin.*, 50(3): 504–512. [冯一璐, 傅晓斌, 吴帆, 崔宏春, 李红亮, 2017. 茶尺蠖信息素结合蛋白 PBP2 的基因克隆、原核表达及其结合功能. 中国农业科学, 50(3): 504–512]

Gao HT, Zhang GL, 2007. Biological characteristics and integrated control measures of *Agrilus zanthoxylumi*. *Shaanxi J. Agric. Sci.*, (2): 183–184. [高焕婷, 张国龙, 2007. 花椒窄吉丁虫的生物学特性及其综合防治措施. 陕西农业科学, (2): 183–184]

Hu YY, Xu SF, Wubie AJ, Li W, Guo ZB, Zhou T, 2013. Research advance of olfactory proteins and olfactory mechanism in insects. *Genomics Appl. Biol.*, 32(5): 667–676. [胡颖颖, 徐书法, Wubie AJ, 李薇, 国宝占, 周婷, 2013. 昆虫嗅觉相关蛋白及嗅觉识别机理研究概述. 基因组学与应用生物学, 32(5): 667–676]

Hua JF, Zhang S, Cui JJ, Wang DJ, Wang CY, Luo JY, Lv LM, Ma Y, 2013. Functional characterizations of one odorant binding protein and three chemosensory proteins from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) (Hemiptera: Miridae) legs. *J. Insect Physiol.*, 59(7): 690–696.

Huang EJ, Guo XX, Zhao TY, 2008. Advances on the olfactory mechanism of insect. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 15(2): 115–119. [黄恩炯, 郭晓霞, 赵彤言, 2008. 昆虫嗅觉反应机理的研究进展. 寄生虫与医学昆虫学报, 15(2): 115–119]

Jacquin JE, Bohbot J, Francois MC, Cain AH, Meillour PN, 2000. Characterization of the general odorant-binding protein 2 in the molecular coding of odorants in *Mamestra brassicae*. *Eur. J. Biochem.*, 267(22): 6708–6714.

Jiang YD, Liang QM, Bai YL, Zhou WW, Liu S, Wang GH, Zhu ZR, 2016. The relationship between odorant binding proteins and host locating behavior of *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(3): 463–471. [蒋艳冬, 梁庆梅, 白月亮, 周文武, 刘苏, 王光华, 祝增荣, 2016. 白背飞虱气味结合蛋白 SfOBP11 与寄主选择行为的相关性研究. 应用昆虫学报, 53(3): 463–471]

Jiao H, 2011. Integrated control of *Agrilus zanthoxylumi*. *Agric. Technol. Serv.*, 28(3): 283. [焦浩, 2011. 花椒窄吉丁虫的综合防治. 农技服务, 28(3): 283]

Jin FL, Dong XL, Xu XX, Ren SX, 2008. Ordinary odorant binding protein II cDNA cloning and expression in prokaryotic cells of

- Spodoptera litura* (Fabricius). *Sci. China Ser. C Life Sci.*, 38 (11): 1076–1083. [金丰良, 董小林, 许小霞, 任顺祥, 2008. 斜纹夜蛾普通气味结合蛋白 II cDNA 的克隆及在原核细胞中的表达. 中国科学 C 辑: 生命科学, 38(11): 1076–1083]
- Li H, 2013. Prevention and control of *Agrilus zanthoxylumi* in spring. *Pestic. Market News*, (12): 45. [李辉, 2013. 春季防治花椒窄吉丁虫. 农药市场信息, (12): 45]
- Li H, Gu TZ, Chen CY, Huang KR, Tian S, Zhao XD, Hao DJ, 2018. cDNA cloning, sequence analysis and expression profile of a chemosensory protein from the *Clostera restitura* (Lepidoptera: Notodontidae). *Sci. Silv. Sin.*, 54(4): 67–75. [李慧, 顾天滋, 陈昌宇, 黄开茹, 田朔, 赵旭东, 郝德君, 2018. 仁扇舟蛾化学感受蛋白 cDNA 的克隆、序列分析及时空表达. 林业科学, 54(4): 67–75]
- Li KM, Yang XB, Xu GY, Cao Y, Lu BQ, Peng ZQ, 2015. Identification of putative odorant binding protein genes in *Asecodes hispinarum*, a parasitoid of coconut leaf beetle (*Brontispa longissima*) by antennal RNA-Seq analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 467(3): 514–520.
- Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Wang SB, Dong SL, Cui JJ, 2015. Odorant-binding proteins display high affinities for behavioral attractants and repellents in the natural predator *Chrysopa pallens*. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 185: 51–57.
- Li ZX, Zhou JJ, 2004. Cloning, identification and expression profiling of the cDNAs of odorant-binding proteins in the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Acta Entomol. Sin.*, 47(4): 417–423. [李正西, Zhou JJ, 2004. 冈比亚按蚊嗅觉结合蛋白候选基因 cDNA 的克隆、鉴定及其表达型分析. 昆虫学报, 47(4): 417–423]
- Liang QM, 2014. RNAi Interference of Odorant Binding Proteins and NADPH-Cytochrome P450 Reductase of Rice Planthoppers. MSc Thesis, Zhejiang University, Hangzhou. [梁庆梅, 2014. 稻飞虱气味结合蛋白与 P450 还原酶的 RNAi 研究. 杭州: 浙江大学硕士学位论文]
- Liu SP, 2017. Analysis of Volatile Substances in Hindgut and Feces of *Agrilus zanthoxylumi*. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [刘绥鹏, 2017. 花椒窄吉丁后肠、粪便挥发性物质分析及其生理活性研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]
- Liu SP, Xie SA, Yuan LF, Cheng HG, 2016. Effect of *Agrilus zanthoxylumi* infection on the volatile constituents of *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Northwest For. Univ.*, 31(5): 246–254. [刘绥鹏, 谢寿安, 袁丽芳, 成宏刚, 2016. 花椒窄吉丁的入侵对花椒挥发物成分的影响. 西北林学院学报, 31(5): 246–254]
- Pelletier J, Leal WS, 2011. Characterization of olfactory genes in the antennae of the Southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 57(7): 915–929.
- Pelosi P, Maida R, 1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol.*, 111B(3): 503–514.
- Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvillo M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell Mol. Life Sci.*, 63(14): 1658–1676.
- Qian K, Feng B, Wu XL, Lao C, Shen YL, Du YJ, 2015. Cloning, sequence analysis, tissue expression profiling and prokaryotic expression of odorant binding protein genes *MaltOBP2* and *MaltOBP6* from *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(5): 496–506. [钱凯, 冯波, 巫明亮, 劳冲, 沈幼莲, 杜永均, 2015. 松墨天牛 OBP 基因 *MaltOBP2* 和 *MaltOBP6* 的克隆、序列分析及组织表达谱和原核表达研究. 昆虫学报, 58(5): 496–506]
- Quan LJ, 2016. Occurrence and prevention measures of *Agrilus zanthoxylumi*. *Shaanxi Agric. Sci.*, 62(12): 116–116. [权丽君, 2016. 花椒窄吉丁的发生及其防治措施. 陕西农业科学, 62(12): 116–116]
- Scaloni A, Monti M, Angeli S, Pelosi P, 1999. Structural analysis and disulfide-bridge pairing of two odorant-binding proteins from *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 266(2): 386–391.
- Si PF, Zhou Q, Cui ZY, 2018. Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of an odorant binding protein gene *BminOBP25* from *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomol. Sin.*, 61(5): 537–545. [司品法, 周琼, 崔中翌, 2018. 柑橘大实蝇气味结合蛋白基因 *BminOBP 25* 的克隆、原核表达及组织表达分析. 昆虫学报, 61(5): 537–545]
- Song YQ, Xie XC, Dong JF, Wu JX, 2014. cDNA cloning, expression profiling and binding properties of odorant-binding protein GmolOBP3 in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(3): 274–285. [宋月芹, 解幸承, 董钧锋, 仵均祥, 2014. 梨小食心虫气味结合蛋白 GmolOBP3 的 cDNA 克隆、表达谱及结合特性分析. 昆虫学报, 57(3): 274–285]
- Steinbrecht RA, 2010. Odorant-binding proteins: expression and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 855(1): 323–332.
- Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.*, 282(2): 203–217]
- Sun KK, 2018. Cloning, Expression and Functional Analysis of Chemoreceptor Genes in *Agrilus mali* Matsumura. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [孙可可, 2018. 苹果小吉丁虫化学感受蛋白基因的克隆、表达及功能分析. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]
- Tang WH, Zhang JL, Wang ZY, Hong MM, 2000. The cause of deviation made in determining the molecular weight of His-tag fusion proteins by SDS-PAGE. *Acta Phytopathol. Sin.*, 26(1): 64–68. [唐威华, 张景六, 王宗阳, 洪孟民, 2000. SDS-PAGE 法测定 His-tag 重组蛋白分子量产生偏差的原因. 植物病理学报, 26(1): 64–68]
- Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828): 161–163.
- Wang CQ, Zhao Y, Cao YZ, Wei HS, Li KB, Zhang S, Peng Y, Yin J, 2017. Expression and binding characterization of odorant binding protein 1 (*AcorOBP1*) in *Anomala corpulenta* (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Entomol. Sin.*, 60(4): 363–371. [王超群, 赵莹, 曹雅忠, 魏红爽, 李克斌, 张帅, 彭宇, 尹姣, 2017. 铜绿丽金龟气味结合蛋白 *AcorOBP1* 的表达和结合特性分析.

昆虫学报, 60(4): 363–371]

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Observation on the ultrastructures of antennal sensilla in *Helicoverpa armigera*. *Sci. Agric. Sin.*, 35(12): 1479–1482. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 棉铃虫触角感器的超微结构观察. 中国农业科学, 35(12): 1479–1482]

Wang J, Guo Y, Chu HL, Guan YP, Bi JW, Wang BC, 2013. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(5): 10015–10041.

Wang R, Zhang XM, Li FQ, Wu F, Li HL, Luo C, 2016. Cloning and prokaryotic expression of odorant binding protein OBP8 in MED cryptic species *Bemisia tabaci* and the binding characteristics with plant volatiles. *J. Plant Prot.*, 43(1): 32–39. [王然, 张晓曼, 李峰奇, 吴帆, 李红亮, 罗晨, 2016. 烟粉虱 MED 隐种气味结合蛋白 OBP8 的克隆、原核表达及与植物挥发物的结合特性. 植物保护学报, 43(1): 32–39]

Wang Y, Li RN, Liu XT, Wang N, 2012. The occurrence and control of *Agrilus zanthoxylumi* in Hancheng. *Shaanxi For. Sci. Technol.*, (1): 76–77. [王燕, 李仁娜, 刘雪涛, 王娜, 2012. 韩城花椒窄吉丁虫的发生及防治. 陕西林业科技, (1): 76–77]

Yuan LF, Xie SA, Liu SP, Lv SJ, Guo XR, Song XB, 2016. Ultrastructure of the antennal sensilla of *Agrilus zanthoxylumi*. *J. Northeast For. Univ.*, 44(1): 94–99. [袁丽芳, 谢寿安, 刘绥鹏, 吕淑杰, 郭新荣, 宋晓斌, 2016. 花椒窄吉丁成虫触角感器超微结构. 东北林业大学学报, 44(1): 94–99]

Zhan WH, Zhang SF, Geng HW, Wang YY, Guo K, Chen J, 2018. Research progress on olfactory recognition proteins of longhorn beetle. *J. Henan Agric. Sci.*, 47(3): 1–6. [詹文会, 张苏芳, 耿红卫, 王野影, 郭昆, 陈君, 2018. 天牛嗅觉感受相关蛋白研究进展. 河南农业科学, 47(3): 1–6]

Zhang GH, Wu JX, 2016. Cloning and prokaryotic expression of general odorant binding protein 2 cDNA from oriental fruit moth, *Grapholita molesta*. *J. Northwest A&F Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 44(6): 111–115. [张国辉, 仵均祥, 2016. 梨小食心虫普通气味结合蛋白 2(GmolOBP2)cDNA 的克隆与原核表达. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 44(6): 111–115]

Zhang S, Pang BP, Zhang L, 2015. Novel odorant-binding proteins and their expression patterns in grasshopper, *Oedaleus asiaticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 460(2): 274–280.

Zhang SX, Xu SQ, Wang GX, Zhou XL, Wang GH, Cui WZ, 2010. Expression of general odorant binding proteins in silkworm *Bombyx mori* and molecular evolution in lepidoteran insects. *Sci. Seric.*, 36(4): 610–618. [张升祥, 徐世清, 王更先, 周晓玲, 王桂花, 崔为正, 2010. 家蚕普通气味结合蛋白基因的表达及分子进化研究. 蚕业科学, 36(4): 610–618]

Zhong T, Yin J, Liu H, Wang JJ, Li KB, Wei YG, Cao YZ, 2008. Cloning and sequence analysis of one general odorant binding protein gene from the meadow moth, *Loxostege sticticalis* (Linnaeus). *Plant Prot.*, 34(4): 31–36. [钟涛, 尹姣, 刘怀, 王进军, 李克斌, 韦永贵, 曹雅忠, 2008. 草地螟触角普通气味结合蛋白基因的克隆及序列分析. 植物保护, 34(4): 31–36]

Zhou JJ, Robertson G, He XL, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM, 2009. Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.*, 389: 529–545.

Zhuo ZH, Yang W, Xu DP, Yang CP, Yang H, Liu CS, Xie TT, 2016. Isolation and purification of an odorant binding protein from *Batocera lineolata* Chevrolat. *J. Nanjing For. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 40(4): 164–170. [卓志航, 杨伟, 徐丹萍, 杨春平, 杨桦, 刘臣山, 谢婷婷, 2016. 一种云斑天牛气味结合蛋白的分离纯化. 南京林业大学学报(自然科学版), 40(4): 164–170]

(责任编辑: 马丽萍)